BAG HEALTH CARE

NOTICE TECHNIQUE D'UTILISATION

Anti-HLA Negative Control
Anti-HLA Positive Control
Anti-HLA Positive Control B-Cell
Anti-HLA Positive Control T-Cell

Test de microlymphocytotoxicité (NIH)

POUR USAGE DE DIAGNOSTIC IN VITRO

CE

Lire attentivement les instructions figurant dans le manuel d'utilisation du ou des système(s) et sur les étiquetages, et/ou dans la notice d'utilisation du réactif.

Description du produit

Le **contrôle positif** anti-HLA est composé d'une globuline (IgG) de lapin anti-lymphocyte humain mélangée à des antisérums humains polyspécifiques.

Le **contrôle négatif** anti-HLA est composé d'un groupe de sérums provenant de plusieurs donneurs masculins de groupe sanguin AB ne présentant aucune réactivité d'anticorps anti-HLA.

Le contrôle positif anti-HLA et le contrôle négatif anti-HLA sont utilisés en tant que réactifs de contrôle dans le test de microlymphocytotoxicité pour le diagnostic *in vitro* des antigènes / anticorps humains HLA de classe I et/ou II.

Les **contrôles positifs** anti-HLA **B-cell** et **T-cel**l sont utilisés dans le test de microlymphocytotoxicité pour vérifier la pureté des cellules après la procédure de séparation.

Tous ces contrôles anti-HLA sont lyophilisés. Avant l'utilisation, dissoudre les sérums de contrôle anti-HLA lyophilisés avec le volume d'eau distillée nécessaire indiqué sur l'étiquette. La reconstitution nécessite 10 à 15 minutes.

Principe du test

Les antisérums HLA réagissent avec les antigènes membranaires correspondants, présents sur les lymphocytes humains. L'ajout de complément de lapin provoque une modification de structure de la membrane cellulaire, qui conduit à la pénétration d'un indicateur coloré. Lymphocytes colorés = réaction positive. En cas d'absence de réaction antigène-anticorps, la membrane cellulaire reste intacte. L'indicateur coloré ne pénètre pas et les cellules restent incolores = réaction négative.

Isolement des lymphocytes

Isolement des lymphocytes à l'aide d'un gradient de densité ou par immuno-billes (IMB) selon les instructions du fabricant.

Protocole du test – Test de microlymphocytotoxicité (classe I)

1. Remplir les puits des plateaux de microtest avec environ 5 à 10 µl d'huile minérale.
2. Distribuer dans chaque puits 1 µl de sérum anti-HLA en-dessous de l'huile à l'aide d'une seringue d'un microlitre. Ajouter 1 µl de suspension de lymphocyte (environ 2 000 à 3 000 cellules) en-dessous de l'huile. De manière à garantir une réaction antigène-anticorps suffisante, il est nécessaire que l'antisérum et les cellules soient en contact.
3. Incuber à une température comprise entre 18℃ et 22℃ (température ambiante) pendant 30 minutes.
4. Ajouter 5 à 6 µl de complément de lapin dans chaque puits et incuber pendant 60 minutes à une température comprise entre 18℃ et 22℃ (température ambiante) (réaction cytol ytique).
5. Ajouter 3 à 4 µl de solution d'éosine (aqueuse, 5 %) à chaque puits et fixer après 5 à 10 minutes avec 5 à 6 µl de solution de formaldéhyde (37 %) (coloration et fixation).
6. Après la sédimentation des lymphocytes (30 à 60 minutes), lire les plateaux de microtest à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase.
7. Recouvrir le plateau d'un couvercle en verre juste avant la lecture.

Distribué en Belgique, en France et au Luxembourg par :

médiane diagnostics SAS - Z.A. de la Chaîne 78370 PLAISIR +33 1.30.07.50.60 info@mediane-diag.fr

Protocole du test – Technique par IMB (classe II)

1. Remplir les puits des plateaux de microtest avec environ 5 à 10 µl d'huile minérale.
2. Distribuer dans chaque puits 1 µl de sérum anti-HLA en-dessous de l'huile à l'aide d'une seringue d'un microlitre. Ajouter 1 µl de la suspension de lymphocyte IMB-B (environ 1 000 cellules) en-dessous de l'huile. De manière à garantir une réaction antigène-anticorps suffisante, il est nécessaire que l'antisérum et les cellules soient en contact.
3. Incuber à une température comprise entre 18℃ et 22℃ (température ambiante) pendant 30 minutes.
4. Ajouter 5 µl de complément de lapin. Incuber à une température comprise entre 18℃ et 22℃ (tempéra ture ambiante) pendant 60 minutes.
5. Ajouter 5 µl de solution d'orange d'acridine / bromure d'éthidium / EDTA.
6. Lire à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Caractéristiques de performances

Les sérums de contrôle positif anti-HLA sont testés en contrôle de qualité avec au moins 50 suspensions de lymphocytes T et B provenant de donneurs différents et ils réagissent conformément à la réaction positive des spécifications (*score* 8).
Les sérums de contrôle négatif anti-HLA sont testés en contrôle de qualité avec au moins 50 suspensions de lymphocytes T et B provenant de donneurs différents et ils réagissent conformément à la réaction négative des spécifications (*score* maximum 2).

Dépannage

Raisons possibles de réactions faussement négatives ou faibles

- Contamination par des érythrocytes, ce qui peut rendre difficile la lecture au microscope.
- Contamination par des plaquettes
- Quantité de lymphocytes trop élevée
- Coloration jaune des antisérums HLA
- Sérums trop souvent décongelés et recongelés
- Complément reconstitué resté trop longtemps à température ambiante avant utilisation
- Reste de complément recongelé puis redécongelé
- Durées d'incubation trop courtes
- Température d'incubation trop faible

Raisons possibles de réactions faussement positives

- Durées d'incubation trop longues
- Température d'incubation trop élevée
- Lymphocytes lésés antérieurement (le contrôle négatif est positif = « bruit de fond »)
- Oubli d'ajout du fixateur
- Contamination croisée due au pipetage

Limites

Le **contrôle positif** anti-HLA ne peut pas être utilisé avec du DTT (dithiothréitol). Des réactions faussement négatives peuvent se produire car les anticorps monoclonaux de lapin présents dans le contrôle peuvent se comporter différemment des anticorps IgG humains lorsqu'ils sont traités par le DTT.

Bibliographie

Bodmer, J. et al., 1997. Tissue Antigens 49:297-321

Avertissements et précautions

Les sérums de contrôle anti-HLA sont uniquement destinés au diagnostic *in vitro* et ils doivent être utilisés par du personnel correctement formé, expérimenté en tests d'histocompatibilité. Les directives de transplantation et les normes EFI doivent être respectées, dans le cas particulier des résultats de typage douteux.
Le matériel d'origine humaine utilisé pour produire ces réactifs a été testé et trouvé négatif pour l'HBsAg et pour les anticorps anti-HIV et anti-HCV. Cependant, tous les matériels biologiques utilisés comme le sang, les sérums et les sérums de contrôle doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses, car aucune méthode de test ne peut garantir l'absence d'agents infectieux dans des produits d'origine biologique. Il est recommandé de respecter les précautions de sécurité adaptées pour manipuler les produits biologiques (ne pas pipeter à la bouche, utiliser des gants jetables pour manipuler les produits biologiques et réaliser le test, se désinfecter les mains une fois le test terminé). Les produits biologiques doivent être inactivés avant leur élimination (ex. : dans un autoclave). Les produits jetables doivent être autoclavés ou incinérés après usage.
Un renversement de produits potentiellement infectieux doit être ramassé immédiatement avec du papier absorbant et les zones contaminées doivent être nettoyées avec un désinfectant standard adapté ou avec de l'alcool à 70 %. Les matériels utilisés pour nettoyer les renversements, y compris les gants, doivent être inactivés avant leur élimination (ex. : dans un autoclave).
Les réactifs du test contiennent du NaN_3 comme conservateur. Les réactifs dissous contiennent une concentration < 0,1 % NaN_3, qui n'est pas considérée comme dangereuse. Toutefois, éviter le contact avec la peau et les membranes muqueuses. Les azides peuvent réagir avec le cuivre et le plomb de certaines tuyauteries et former des sels explosifs. Les quantités d'azide utilisées dans cette trousse sont faibles. Cependant, laisser couler une grande quantité d'eau dans l'évier au moment d'éliminer les réactifs comportant de l'azide. L'élimination de tous les échantillons et matériels du test doit respecter les réglementations nationales et locales.
Prendre connaissance des avertissements et des précautions du fabricant de la solution de formaldéhyde et d'orange d'acridine / bromure d'éthidium.

Avertissements de risque (R) 22-52/53 (uniquement pour les sérums anti-HLA non dissous)
Dangereux en cas d'ingestion.
Dangereux pour les organismes aquatiques, peut provoquer des effets indésirables à long terme dans l'environnement aquatique.

Avertissements de sécurité (S) 22-61/ (uniquement pour les sérums anti-HLA non dissous)
Ne pas respirer les poussières.
Éviter de disséminer dans l'environnement. Se référer aux instructions particulières dans les fiches de données de sécurité.

Les fiches de données de sécurité sont disponibles sur demande.

Ne pas utiliser les **sérums de contrôle anti-HLA** au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Conservateur : < 1 % NaN_3 (lyophilisé), dangereux ; < 0,1 % NaN_3 (dissout)

Durée de conservation :
- sous forme lyophilisée, jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette
- sous forme dissoute, 3 mois

Stockage : entre 2 °C et 8 °C, dissout à ≤ -20 °C

Conditionnement : 0,5 ml, d'origine humaine ou monoclonale, lyophilisé

Explication des symboles utilisés sur les emballages			
	Température de conservation	LCT NIH	Test de lymphocytotoxicité selon le NIH
	Date de péremption		Consulter la notice technique d'utilisation
ANTI-HLA-SERA	Sérums anti-HLA	IVD	Pour usage de diagnostic *in vitro*
REF	Code produit	LOT	Code de lot
HUM	Origine : humaine	LYOPH	Lyophilisé

N.B.: pour les *modes d'emploi* en d'autres langues, veuillez utiliser ce lien :

http://www.bag-healthcare.com/en/Diagnostika/Downloads/

Version 1/2013

BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich / Germany
Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 0
Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 250
www.bag-healthcare.com
info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 450
Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 125
Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 421
service@bag-healthcare.com